วิธีการวิจัย

การสกัดส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ และสารอะซีแมนแนน[10,13]

ก้านว่านหางจระเข้ (*Aloe barbadensis* Miller) ที่สมบูรณ์ ไม่มีรอยโรค มีขนาดความกว้างและหนาที่ตำแหน่งโคนก้าน ประมาณ 3-4 นิ้ว และ 1 นิ้ว ตามลำดับ ทำการปอกเปลือกล้างเพื่อกำจัดส่วนยาง จากนั้นบดส่วนวุ้นว่านหางจระเข้ให้ละเอียดด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ (homogenizer) และปั่นแยกตะกอนกากออกด้วยเครื่องปั่นตกตะกอนความเร็วสูง เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสมากรองผ่านฟิลเตอร์ ขนาด 0.2 ไมครอน ต่อมาทำการตกตะกอนโพลี-แซคคาไรด์ด้วยเอธิลแอลกอฮอล์เข้มข้นสมบูรณ์ (absolute ethyl alcohol) นำตะกอนที่ได้ทำให้แห้งละเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อการพิสูจน์เอกลักษณ์ตามน้ำหนักโมเลกุลด้วย size exclusive chromatography เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน โดยสารอะซีแมนแนนควรมีมวลโมเลกุลมากกว่า 100,000 Da (100 KDa) หากสารอะซีแมนแนนที่ได้มีความบริสุทธิ์น้อยกว่าร้อยละ 90 จะนำมาทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วย Dialysis bag ที่คัดกรองแยกมวลโมเลกุลที่ 100,000 Da และทดสอบโครงสร้างของโมเลกุลด้วยเทคนิกอินฟราเรด สเปกโตรสโคปี (infrared spectroscopy) และเทคนิคนิวเคลียร์ แม็คเนติก เรโซแนนซ์ (nuclear magnetic resonance: NMR) โดยผลที่ได้ยืนยันว่าสารสกัดที่ได้เป็นอะซีแมนแนน

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์สร้างเคลือบรากฟันของมนุษย์[15]

เซลล์ไลน์สร้างเคลือบรากฟันของมนุษย์ เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดอัลฟา เอ็มอีเอ็ม (α-MEM: Minimum Essential Medium) ซึ่งประกอบด้วยฟีตัลโบวายน์ซีรัม (fetal bovine serum) ความเข้มข้นร้อยละ 10 แอล-กลูตามีน (L-glutamine) ความเข้มข้น 2 มิลลิโม

ลาร์ เพนนิซิลลิน จี (Penicillin G) ความเข้มข้น 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและแอมโฟเทอริซิน บี (Amphotericin B) ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในตู้อบเพาะเลี้ยง (carbondioxide incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 โดยในการศึกษาครั้งนี้ จะทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน

วิธีการเข้าร่วมของสารรังสีตริเตรียมไธมิดีน (^{3}H-Thymidine incorporation assay)

เซลล์ไลน์สร้างเคลือบรากฟันจะถูกเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม ในจำนวน 50,000 เซลล์ต่อหลุมและทดสอบด้วยสารอะซีแมนแนนในความเข้มข้นที่กำหนดและทำการเติมสารรังสี (^{3}H-Thymidine) 0.25 μCi ต่อหลุม เพื่อให้เซลล์นำไปใช้ในการสร้างสายดีเอ็นเอในระหว่างการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ เมื่อครบ 24 ชั่วโมงจะทำการล้างด้วยสารละลายโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (potassium phosphate buffer; PBS pH 7.6) และตรึงเซลล์ด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติก ต่อมาเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เพื่อย่อยเซลล์และสายดีเอ็นเอ โดยทิ้งไว้นานประมาณ 18 ชั่วโมง จากนั้นปรับความเป็นกรด-ด่าง ให้เป็นกลางด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ใส่สารขยายสัญญาณรังสีหรือซิลทิเลชันค็อกเทล (OptiPhase HiSafe; Wallac,Milton Keynes, UK) แล้ววัดจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้น ด้วยการวัดปริมาณสารรังสีโดยอาศัยเครื่องวัดกัมมันตรังสีเบต้า (liquid scintillation counter) ในการทดลองครั้งนี้ จะใช้เซลล์จำนวน 3 หลุมในแต่ละความเข้มข้นของสารอะซีแมนแนน การทดลองจะถูกทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง

การตรวจวัดปริมาณเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอตฟาเตส

เซลล์ไลน์สร้างเคลือบรากฟันจะถูกเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม จำนวน 50,000 เซลล์ต่อหลุมและทดสอบด้วยสารอะซีแมนแนนในความเข้มข้นที่กำหนดเป็นเลา 3 วัน และ 6 วัน โดยทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน วิธีการตรวจวัดกล่าวโดยย่อคือ นำ substrate solution (2 mg/ml P-Nitrophenylphosphate ใน substrate buffer ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 10.4) ใส่ลงไปในแต่ละหลุมของจานเพาะเลี้ยง บ่มไว้ในที่มืดจนกระทั่งสังเกตเห็นสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลือง หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลลาร์ แล้วจึงนำไปตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ซึ่งค่าที่ได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับกิจกรรม (activity) ของเอนไซม์ ซึ่งจะนำมาปรับเทียบโดยการหารด้วยค่าโปรตีนรวมที่ได้มาจากการทำ whole cell lysate[30]

การวัดปริมาณคอลลาเจน ด้วยวีธีอีไลซา (ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

เซลล์ไลน์สร้างเคลือบรากฟันจะถูกเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม จำนวน 50,000 เซลล์ต่อหลุมและทดสอบด้วยสารอะซีแมนแนนในความเข้มข้นที่กำหนด เมื่อครบเวลาที่กำหนดอาหารเลี้ยงเซลล์ (condition media) จะถูกรวบรวม และตรวจวัดหาปริมาณโปรตีนคอลลาเจนด้วยวิธีอีไลซาโดยใช้ชุดวัดปริมาณคอลลาเจน (Procollagent type I C-peptide, Takara Bio. INC, Shiga, Japan) ทำตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต กล่าวโดยย่อ อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกนำมาหยอดในหลุมที่มีแอนติบอดี้ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนคอลลาเจน จากนั้นเขย่าด้วยเครื่องหมุนในแนวราบตามความเร็วที่บริษัทกำหนด ต่อมาล้างเพื่อกำจัด

โปรตีนอื่นๆที่ไม่ใช่คอลลาเจนออกจากหลุม เติมสารละลายซับสเตรท (substrate) เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำมาตรวจวัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรค่าที่อ่านได้จะถูกเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน และคำนวณเป็นความเข้มข้นของคอลลาเจนในหน่วยของไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การตรวจวัดปริมาณโปรตีนออสติโอพอนติน ด้วยวิธี Western blot

เซลล์ไลน์สร้างเคลือบรากฟันจะถูกเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม จำนวน 50,000 เซลล์ต่อหลุมและทดสอบด้วยสารอะซีแมนแนนตามความเข้มข้นที่กำหนดเป็นเวลา 6 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วัน เมื่อครบระยะเวลา เซลล์จะถูกรวบรวมเพื่อแยกสกัดโปรตีนภายในเซลล์ด้วยสารละลายไลซีสบัฟเฟอร์ (RIPA lysis buffer; sc-24948, Santa Cruz Biotechnology, California,USA) และตรวจวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยชุดตรวจวัดปริมาณโปรตีน (BIO-RAD, USA) โปรตีนโดยรวม 50 ไมโครกรัมจะถูกนำไปต้มเป็นเวลา 3 นาที และนำมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (Electrophoresis) โดยใช้อะคริลามายด์เจลที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 (SDS-PAGE) จากนั้นโปรตีนจะถูกเคลื่อนย้ายจากแผ่นเจลไปยังแผ่นเมมเบรน (PVDF membrane) ด้วยกระแสไฟฟ้า แผ่นเมมเบรนจะแช่ในสารละลายบล็อคกิ้ง (5% skim milk solution) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วนำไปทดสอบกับแอนติบอดี้ที่เฉพาะต่อโปรตีนออสติโอพอนติน (sc—10591, Santa Cruz Biotechnology, California,USA) ตามด้วยแอนติบอดี้ทุติยภูมิที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และตรวจวัดสัญญาณโปรตีนด้วย Enhanced Chemiluminescence (ECL) western blotting detection reagent kit (Amersham Life Science,

USA) โดยสัญญาณที่ได้จะปรากฏบนแผ่นฟิลม์ตามปริมาณของโปรตีนที่ศึกษา และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องอ่านความเข้มข้นเดนซิโตมิเตอร์ (densitometer)

การย้อมก้อนตะกอนแร่ธาตุด้วยสารละลายอะลิซารินเรด (alizarin red staining)

เซลล์ไลน์สร้างเคลือบรากฟันจะถูกเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม จำนวน 50,000 เซลล์ต่อหลุมและทดสอบด้วยสารอะซีแมนแนนตามความเข้มข้นที่กำหนดเป็นเวลา 21 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วัน เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด เซลล์จะถูกล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และตรึงเซลล์ด้วยสารละลายฟอร์มาลินความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นย้อมเซลล์ด้วยสารละลายอะลิซารินเรดความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อดูขนาดและจำนวนก้อนตะกอนแร่ธาตุ หลังจากนั้นทำการละลายสีด้วยสารละลายเซปติลไพริเดียมคลอไรด์ (ceptylpyridium chloride) ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง[30] และตรวจวัดการดูดกลืนแสงของสีที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จะถูกวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) หาค่าเฉลี่ย (mean) และความผิดพลาดมาตรฐาน (standard error) และเปรียบเทียบความแตกต่างของกลุ่มเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารอะซีแมนแนนกับกลุ่มควบคุมลบ โดยใช้สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way Analysis of Variance) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95